Beiträge zur Kenntnis

der

SACCHAROMYCETEN.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen philosophischen Fakultät

der

Königl. bayr. Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

FRITZ VON NEUDECK,
aus Stuttgart.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 1894.

Stuttgart.
Königl. Hofbuchdruckerei Carl Liebich.
1895.

Gedruckt mit Genehmigung der hohen philosophischen Fakultät der Universität Erlangen

Referent: Prof. Dr. M. Reess.

Seinen lieben Eltern

aus Dankbarkeit

gewidmet vom

Verfasser.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535724_0043

Bei der grossen Wichtigkeit, welche die hoch entwickelten Gärungsgewerbe heute besitzen, ist es nicht zu verwundern, wenn zahlreiche Praktiker sowohl als Theoretiker sich mit den einschlägigen Verhältnissen eingehend beschäftigen. Es ist durchaus nicht gering anzuschlagen, dass bedeutende Männer der verschiedenen Nationen sich in hervorragender Weise damit befasst haben, die im Verlaufe genauerer Beobachtung aufgetauchten Fragen zu lösen.

Fordern nicht die bereits errungenen und teilweise schon praktisch verwerteten Erfolge ein intensives Weiterbauen auf den festgelegten Fundamenten geradezu heraus?

Seit den ältesten Zeiten wurden Gärungserscheinungen beobachtet (Noah, Moses), schon die Alchemisten des Mittelalters verglichen diese Vorgänge mit chemischen Prozessen, dem Revolutionszeitalter war es auch in dieser Beziehung vorbehalten, neue Gedanken, glückliche Ideen aufzubringen und an der Hand kühner, wenn auch nicht einwandfreier Experimente unter Benützung der epochemachenden Entdeckungen von Lavoisier zu versuchen, der Natur ein grosses Geheimnis zu entreissen.

Lange Zeit war erforderlich, manches Vorurteil war zu überwinden, bis der Begriff „Gärung“ eine endgültige Fassung fand, da die oft nebeneinander verlaufenden Prozesse der Fermentation, der Gärung und der Fäulnis die Beobachtung ungemein erschwerten.

Der besonders in Deutschland vielfach verbreitete Autoritätsglauben trug nichts zu einer raschen Klärung der Ansichten bei, da der Auffassung eines Liebig entgegenzutreten von Beginn an für gewagt, ja für aussichtslos galt.

Die Erklärung der chemischen Vorgänge bei der Entstehung von Alkohol wurde schon von Lavoisier versucht, die von Liebig aufgestellte Theorie, welche auf rein chemisch-physikalischer Grundlage ruht bei vollständiger Vernachlässigung der organisierten Natur der Hefe, war bis vor nicht zu langer Zeit allgemein als den thatsächlichen Verhältnissen entsprechend angesehen.

Eine feste Grundlage fand Liebig's Anschauung in dem Umstande, dass es schon Gay-Lussac gelungen war, eine durch ihre Einfachheit geradezu ideale Formel aufzustellen für den Vorgang der Bildung von Kohlensäureanhydrit und Aethylalkohol aus Zucker.

Interessant ist es, dass Gay-Lussac ursprünglich glaubte, Rohrzucker zerfalle direkt und dass er deshalb dessen Formel abänderte in der Annahme, seine Analyse sei nicht ganz richtig gewesen.

$$C_6 H_{12} O_6 = 2CO_2 + C_2 H_5 (OH).$$

Heute noch gilt diese Gleichung als einfachster Ausdruck für den wichtigsten Prozess bei der alkoholischen Gärung.

Alle Zweifel wurden scheinbar beseitigt, als ein der Diastase ähnliches Ferment aus der Hefe genommen wurde, welches man als Invertin bezeichnete und welches die Eigenschaft besitzt, den Rohrzucker unter Aufnahme der Bestandteile des Wassers in Traubenzucker und Frucht-

zucker zu spalten d. h. zu invertieren nach dem Schema:

$$C_{12} H_{22} O_{11} + H_2O = C_6 H_{12} O_6 + C_6 H_{12} O_6$$

Über die Wirkungsweise dieses Fermentes ist noch nichts Positives bekannt geworden, doch ist anzunehmen, dass ziemlich verwickelte Verhältnisse vorliegen.

L. Pasteur war es vorbehalten, in hervorragender Weise darzuthun, dass Gärung hervorgerufen werde durch Mikroorganismen, in seinen 3 berühmten Werken: Etudes sur le vin 1866; Etudes sur le vinaigre 1868 und Etudes sur la bière 1876.

Dem heutigen Stand der Ansichten entspricht am besten die von A. Mayer in seinem Lehrbuch der Gärungschemie aufgestellte Definition:

„Gärung ist eine chemische Umsetzung von gelösten organischen Substanzen, welche nicht nach den gewöhnlichen Regeln der chemischen Verwandtschaft zu erfolgen scheint und für deren Fortgang die infizierende Wirkung einer verhältnismässig kleinen Menge eines andern, organischen Stoffes, eines Gärungsträgers angenommen wird, als solche Gärungsträger kennt man eine grosse Zahl von niedrigen, chlorophyllfreien Organismen."

Nachdem durch Pasteur die pflanzliche Natur der bei der Gärung auftretenden Organismen festgestellt war, unternahm M. Reess im Jahre 1870, gestützt auf die von ihm systematisch durchgeführten Versuche über die Vermehrung und Veränderuug der Hefezellen den Begriff Hefe zu definieren und eine wissenschaftliche Bezeichnung und Einteilung der Hefepilze zu geben.

Nach demselben ist der Begriff „Hefe" jedes allgemein morphologischen oder botanisch deskriptiven Charakters zu entkleiden und zwischen dem Gemenge von

Pilzen, Salzniederschlägen, organischen Resten etc. „Hefe“ einerseits, und den einzelnen, in der Hefe vorkommenden Organismen anderseits streng zu unterscheiden.

Sich beziehend auf den von ihm zuerst genauer studierten Vorgang der Sporenbildung, einer freien Zellbildung im Innern der Hefezellen, ordnete er dieselben unter dem Namen Saccharomyceten unter die Ascomyceten ein.

Durch die anfangs der achtziger Jahre in rascher Reihenfolge veröffentlichten Entdeckungen R. Koch's waren neue Gesichtspunkte in Bezug auf die Mikroorganismen und besonders deren Reinkultur erschlossen worden und zugleich suchte die Technik den gesteigerten Anforderungen gerecht zu werden und stellte den Forschern optische Hilfsmittel zur Verfügung, welche die Arbeit um viel erleichterten.

E. Chr. Hansen verwertete mit praktischer Hand die Erfolge der wissenschaftlichen Forschung und übertrug die im Kleinen angestellten Versuche in den Grossbetrieb; der Erfolg blieb nicht aus, heute behauptet das von ihm gegründete und geleitete Carlsberger Laboratorium eine führende Stellung im Gärungsgewerbe.

Der Beobachtung der Saccharomyceten stellen sich besondere Schwierigkeiten entgegen, indem das einzelne Individuum infolge der geringen Grösse und der zarten Konstitution nicht mechanisch zerlegt werden kann, — im Gegensatz zu den viel kleineren Bakterien besitzen die Hefezellen eine derbere, widerstandsfähigere Membran, der Zellinhalt ist in chemischer Beziehung so wenig gesondert und geschieden, dass sich mit mikrochemischen Reaktionen und Färbemethoden nur wenig erkennen lässt.

So kam es, dass bis vor kurzem die Frage: Besitzt jede Hefezelle einen Zellkern? noch eine offene war und erst in neuester Zeit wurden 25jährige oft befehdete Beobachtungen durch neue Versuche als richtig erkannt.

Angeregt durch die Untersuchungen über Zellkerne von Schmitz und Strasburger und durch die Arbeit von Raum: Zur Biologie und Morphologie der Sprosspilze unternahm Dr. H. Möller (1892) die verschiedenen Methoden der Zellkernfärbung auf ihre praktische Verwertung bei den Saccharomyceten zu prüfen und gelangte dabei zu dem Resultate, dass jede Hefezelle einen Kern besitzt, dass dagegen die von Reess beobachteten „Sporen", weil dieselben weder Kern noch Membran besitzen, keine wirklichen Sporen seien, sondern er erklärt dieselben für Sprossungen mit gelatinöser Netzbildung, deren sichere Deutung bei den Reess zur Verfügung gewesenen optischen Hilfsmitteln und ohne Tinktion kaum erwartet werden konnte, woraus er den Schluss folgerte: Das Genus Saccharomyces sei zu streichen. —

Nachdem Hansen die Reess'chen Ansichten in Schutz genommen hatte, sah sich H. Möller auf Grund neuer Versuche veranlasst, im Jahre 1893 zuzugeben, dass die Saccharomyceten echte Sporen mit Zellkern und Membran in der Mutterzelle bilden und lässt nur die Frage der Stellung im System noch als offene gelten.

H. Möller geht bei seinen Untersuchungen von dekantierter Weissbierhefe aus und verzichtet auf die Gewinnung einer Reinkultur: 1) um Zeit und Mühe zu sparen, 2) weil er gefunden zu haben glaubt, dass solche Rohhefe, wenn ich den Ausdruck hiefür gebrauchen darf, zu seinen Sporenbildungsversuchen sich besser eigne und

wegen der Dünnwandigkeit der Membran Färbungen leichter zugänglich sei. Die von mir mit solcher Rohhefe angestellten Versuche kosteten mich jedoch mehr Zeit und Mühe, da die Resultate sehr gering waren, als die Darstellung einer Reinkultur zur Gewinnung von Ausgangsmaterial.

Wenn Reess auf Sterilität und Reinkultur verzichtete, so geschah dies aus dem einfachen Grunde, weil die damaligen Methoden ungenügend waren, im allgemeinen heute noch gar keine Sterilisation einer ungenügenden gleichwertig ist.

Heute stehen sich zwei Methoden der Gewinnung einer Reinkultur gegenüber: Hansen contra Koch und Just. Chr. Holm hat die Koch'sche Methode einer eingehenden Prüfung und Kritik unterzogen und die Resultate in dem Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg 1891 niedergelegt.

Es ist nicht meine Absicht, eine Beschreibung der einzelnen Methoden zur Gewinnung einer Reinkultur zu geben, jedoch dürfte es wohl angezeigt sein, die wichtigsten anzuführen, um hiebei die Hauptpunkte, welche in Betracht kommen, zu erwähnen, besonders mit Rücksicht darauf, dass in der oben angeführten Arbeit Holm der Koch'schen Methode die Brauchbarkeit bei Hefekulturen beinahe abspricht und dass ich gerade die Koch'sche Vorschrift mit geringen Modifikationen als beste schätzen gelernt und angewandt habe, wenn es sich darum handelt, aus einer Rohhefe die Hauptkomponenten zu ermitteln.

Die ersten Versuche, Reinkulturen zu gewinnen, scheinen heute beinahe absurd und doch kann man darin

schon die ersten Andeutungen zur fraktionierten Kultur erkennen. Pasteur lässt Hefe mit Gips trocknen und den Staub dann aus gewisser Höhe in kurz zuvor geöffnete sterilisierte Kolben fallen; die grosse Rolle, welche hier dem Zufall eingeräumt ist, liegt auf der Hand.

Eine zweite Methode beruht darauf, dass die im Überschuss vorhandene Art bei günstigen äusseren Bedingungen die anderen sozusagen überwuchert, indem sie die brauchbaren Nährstoffe an sich zieht und aufbraucht und daraus Produkte bildet, welche andere Arten an ihrer Entwicklung hindert.

Diese Ansicht hat in der Brauereitechnik heute noch scheinbare Geltung, aber je kleiner die angewandten Mengen sind, um so grösser werden die Fehler.

Das Nägelische Verfahren der Verdünnung und annähernden Zählung der in einem Tropfen Flüssigkeit sich befindenden Individuen wurde von Hansen dahin verbessert, dass derselbe einen festen Nährboden in die feuchte Kammer verbrachte zur besseren Fixierung der einzelnen Zellen und dass er ein Zeichen angab, woraus mit beinahe absoluter Sicherheit die Reinheit einer Kultur nach 24 Stunden bereits zu ersehen ist.

Wird nämlich der infizierte Kolben stark geschüttelt, so setzen sich die Zellen an die Glaswand an, um von dem Anheftungspunkte aus zu wachsen. Findet sich nur ein solcher Fleck, so ist die Kolonie aus einer einzigen Zelle hervorgegangen und wenn die sonstigen Bedingungen erfüllt sind, haben wir die Reinkultur.

Es ist das Verdienst von R. Koch, feste, durchsichtige Nährböden eingeführt zu haben, so dass die einzelnen

Vegetationen an Ort und Stelle isoliert voneinander fixiert bleiben.

Wird beim Kochschen Verfahren des Plattengusses zu den beiden ersten Verdünnungen Wasser statt verflüssigter Gelatine genommen und lange genug geschüttelt, so wird sich bei Anwendung von sogenannten Petrischalen an Stelle von Glasplatten leicht und sicher eine Reinkultur erzielen lassen.

Es wurde in folgender Weise vorgegangen, um zu Reinkulturen der später beschriebenen Hefearten zu gelangen.

Eine Platinöse voll Rohhefe wurde in sterilem Wasser fein verteilt, einigemale dekantiert und dann mit steriler 5 % Traubenzuckerlösung versetzt.

Nach 24stündigem Stehen unter bisweiligem Umschütteln bei 15—20° wurden nach Kochs Vorschrift drei Verdünnungen gemacht 0 und I mit sterilem Wasser. II mit 5,5 % Gelatine enthaltender Traubenzuckernährsalzlösung, deren Zusammensetzung später angegeben ist.

Nach weiteren 24 Stunden lassen sich bereits in der absichtlich ganz dünn ausgegossenen Schicht kleine weissliche Pünktchen als Anfänge der einzelnen Kolonien erkennen; eine grössere Anzahl derselben wird nun genau durchmustert und von unten durch die Öffnung des Objekttisches mittels eines Ölstiftes solche Kolonien markiert, welche gleichförmig rundlichen Umfang besitzen, verhältnismässig grossen Abstand vor anderen Kolonien haben und in überwiegender Menge auf der Platte auftreten.

Diese Kolonien wurden mittels des Platindrahtes unter Kontrolle durch ein schwaches Objektiv sodann auf die entsprechend vorbereiteten Substrate verbracht.

Das Einbringen der Hefe in Traubenzuckerlösung bezweckt, die Hefe etwas zu beleben, um nicht beim Plattenguss durch langsame, ungleichmässige Entwicklung der Kolonien zu sehr hintangehalten zu werden. Der Erfolg ist auch ein sicherer, denn nach Holms Versuchen entwickelten sich von Hefepilzen, welche am Ende ihrer Thätigkeit waren, 75 % gegen 95 % von im Anfangsstadium sich befindender, ein Resultat, welches mit meinen Erfahrungen übereinstimmt.

Ein Umstand tritt jedoch hindernd in den Weg, dass sich sprossende Hefe weniger leicht verteilen lässt und daher die Aussicht auf eine Reinkultur etwas herabmindert.

Holm äussert sich darüber folgendermassen:

„Toutes les espèces de levûres, que nous avons employées semblent présenter cette particularité que les cellules prises au commencement de la fermentation se séparent plus difficilement les unes des autres que celles qui sont prises à la fin de la fermentation. De là on peut tirer la conclusion que l'erreur commise en employant la culture sur plaques est moindre si les cellules proviennent de la fin de la fermentation que si elles proviennent du commencement de celle-ci.

Geht man nach Hansens Vorschlag von einem einzelnen Individuum aus, welches man in der feuchten Kammer in Gelatine beobachtete, so kann der Fall eintreten, dass gerade dessen Gattung nur in wenigen Exemplaren in der betreffenden Hefe enthalten ist, beim Vergleich der angegangenen Kolonien giebt es eine Menge von Anhaltspunkten, um sich zu vergewissern, ob man

es mit dem Hauptvertreter der zu züchtenden Hefe zu thun hat.

Ein wichtiges Hilfsmittel zur Erkennung und Unterscheidung von einzelnen Bakterien liegt in dem verschiedenem Verhalten derselben gewissen Farbstofflösungen gegenüber, leider trifft dieser Umstand bei den Saccharomyceten nicht zu, daher sind die Ansichten über den Wert von Färbungen bei der Untersuchung von Hefepilzen geteilt und Joergensen äussert sich darüber folgendermassen:

„Für gärungsphysiologische Zwecke, wo die Organismen fast immer freiliegen und nur selten mit störenden Organismen vermischt sind, sind solche Färbungen und Entfärbungen gewöhnlich nicht notwendig und nur in wenigen Fällen führte eine Färbung zu Speziescharakteren."

Den mikrochemischen Reagentien zum Nachweis von Tannin, Stärke, Harzen in den Hefezellen lässt er volle Würdigung angedeihen.

Manche Forscher verlegten sich auf den Nachweis der Zellkerne in den einzelnen Mikroorganismen und es entbrannte bald ein ebenso hitziger, als lang andauernder Streit über die Frage: Besitzt jede einzelne Hefezelle einen Kern oder ist den dafür gehaltenen Körpern eine andere Bedeutung zuzuschreiben?

Die systematischen Untersuchungen der verschiedenen Agentien und Methoden von Dr. Möller (Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde 1892) haben zu dem Resultate geführt, dass jede Hefezelle einen Zellkern besitzt, dass aber verschiedene frühere Autoren andere Körper für den Kern angesehen hatten.

Die einfachste Methode, die Hefezellen mit wässerigen Anilinfarblösungen zu behandeln, ist resultatlos, da nur abgestorbene Hefezellen den Farbstoff direkt aufnehmen.

Eine Ausnahme hievon macht nur die sogenannte Methylgrünessigsäure, welche als einfachste Kernfärbungsflüssigkeit bei niederen pflanzlichen Organismen häufig angewandt wird, die Zellkerne werden erkennbar, doch ist das Präparat nicht haltbar, nach einiger Zeit ist der ganze Zellinhalt gleichförmig durchfärbt

Nach den von Koch, Ehrlich, Ziehl, Löffler und anderen angegebenen Färbungsmethoden bei der Hefe vorzugehen, hat keinen grossen Wert, denn handelt es sich bei den Bakterien in erster Linie um die Kontour, so soll hier der Inhalt der einzelnen Zellen durch die Färbung unterschieden werden.

Hier stellen sich auch noch andere Schwierigkeiten ein, denn die zarte Membran schliesst einen so kompliziert zusammengesetzten und empfindlichen Inhalt ein, dass die Anwendung von Wärme, Chemikalien etc. grosse Veränderungen, ja Zerstörungen hervorruft, so dass dadurch die Beobachtung nicht unterstützt und gefördert, sondern beinahe unmöglich gemacht wird.

Da das Eintrocknen und durch die Flamme Ziehen des Ausstrichpräparates in der von Koch angegebenen Weise zum Zwecke des Fixierens nicht thunlich ist, musste auf andere Weise vorgegangen werden und es ist Möllers Verdienst, zuerst festgestellt zu haben, dass Härten und Fixieren, da an sich verschieden, auch zwei verschiedene und gesonderte Operationen verlangen.

Die von ihm vorgeschlagene Fixierflüssigkeit, eine

1 % Jodkalilösung, welche mit Jod gesättigt ist, eignet sich vorzüglich zu diesem Zwecke. Jod ist entschieden angenehmer im Gebrauch als die seither verwendete Osmiumsäure und das Jodkali, besitzt überdies die Eigenschaft, die Membran etwas aufzuquellen und so diffusibler zu machen.

An Algen und Schimmelpilzen zum Vergleich angestellte Versuche ergaben, dass Jodjodkalilösung in obiger Verdünnung keine Veränderung des Zellinhaltes oder eine Plasmolyse hervorruft und hat sich diese Flüssigkeit zum Fixieren sehr bewährt.

Alkohol galt bis heute als eines der zuverlässigsten Härtungsmittel, in einer neueren Veröffentlichung im Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde (1893) empfiehlt Möller an Stelle des bisher angewandten Alkohols einfaches Kochen der Deckglaspräparate in Wasser, dem etwas Glycerin zugefügt ist, um die Siedetemperatur etwas über 100° C zu erhöhen und das heftige Stossen zu vermeiden.

Die eigenartige Wirkung des kochenden Wassers lässt sich am besten mit dem Vorgang vergleichen, der eintritt, wenn der Niederschlag von Cuprioxydhydrat durch Kochen unter Wasserausscheidung in Cuprioxyd übergeht.

Jone und nach ihm Klett haben zu einem ähnlichen Verfahren gegriffen, durch Kochen der Präparate mit Milzbrandstäbchen die die letzteren umgebenden Kapseln zu fixieren und der weiteren Behandlung zugänglich zu machen.

Mit so vorbereitetem Material lassen sich nun alle bisher gebräuchlichen Färbungsmethoden mit Leichtigkeit

ausführen, Schwierigkeiten bietet die Entfärbung und die Kontrastfärbung.

Nach Möllers Vorschlag wurden Versuche angestellt, mit Glycerin eine Differenzierung zu erhalten, die damit erzielten Resultate waren zufriedenstellend.

Die Reihenfolge der Operationen zur Färbung der Saccharomyceten ist nach dem oben Angeführten folgende:

Ausstreichen des Materiales auf dem Deckglase in möglichst dünner, gleichmässiger Schicht.

Zusatz von einem Tropfen Jodjodkalilösung und Eintrocknenlassen bei gewöhnlicher Temperatur (Fixage).

Leichtes Abspülen des Präparates mit Wasser, Alkohol, Äther (zur Entfernung des Fettes).

Zwei Minuten lang Kochen in mit 10 % Glycerin versetztem Wasser (Härtung), Abwaschen mit Wasser und Trocknen. Die so vorbereiteten Präparate lassen sich unbegrenzt lange aufbewahren und eignen sich zu allen weiteren Operationen.

Besonders geeignet erwiesen sich folgende Kernfärbungsmethoden:

1) in Delafields Hämatoxylinlösung $^1/_2$ Stunde stark überfärbt, sodann mit Wasser leicht abgespült, sogleich mit einer 3 % Lösung von schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak (Eisenbeize) differenziert und ausgewaschen.

Während hier die Wirkung des Entfärbungsmittels eine sehr rasche ist und in 1—2 Minuten erfolgt, kann mit Hilfe von konzentriertem Glycerin ebenfalls entfärbt werden, jedoch dauert diese Entfärbung 12—24 Stunden. Das Glycerin wird sogleich ausgewaschen und treten die Zellkerne sehr deutlich gefärbt hervor.

2) 15 Minuten Behandeln mit Gramm's Anilinmethylenblau, Abwaschen mit Wasser, Entfärbung mit Jodjodkali, Differenzierung mit Nelkenöl, welches Eosin gelöst enthält.

Dieses Verfahren giebt sehr deutliche Bilder, da sich Kern, Mikrosome und Membran verschiedenartig gefärbt erweisen.

3) Am einfachsten und raschesten wird in folgender Weise vorgegangen: Das Präparat wird $^1/_2$ Stunde in Methylgrünessigsäure überfärbt und leicht mit Wasser abgespült.

Leider ist die Dauer und Haltbarkeit dieser Färbung eine sehr beschränkte.

Weniger günstige, wenn auch immer noch gute Resultate erzielte ich nach dem von Möller angegebenen Verfahren, welches von M. Heidenhain als Haematoxylin-Eisenlackfärbung in seiner Untersuchung über „Kern und Protoplasma" in der Festschrift für Kölliker 1892 zuerst empfohlen wurde.

Das fixierte und gehärtete Material bleibt 2 Stunden in 3% Lösung von schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak, worauf man nach dem Abspülen mit Wasser $^1/_2$ Stunde eine gesättigte, wässerige Hämatoxylinlösung einwirken lässt.

Die stark überfärbten Präparate werden nach gründlichem Auswaschen in Wasser unter steter Kontrolle unter dem Mikroskope in 30—60 Sekunden mit der oben erwähnten Eisenlösung differenziert.

Wegen des raschen Verlaufes des letzten Prozesses ist es nicht leicht, gleichmässige Resultate zu erzielen.

Wie für die Saccharomyceten eignen sich sämtliche

eben erwähnten Methoden zur Sichtbarmachung des Zellkernes auch für Algen und Pilze.

Leider war es mir nicht möglich, trotz zahlreicher, dahin zielender Versuche, karyokinetische Figuren zu beobachten, welche es erlaubt hätten, den Vorgang der Zell- und Zellkernteilung bei der Sprossung der Hefe näher zu studieren.

Anders gestaltet sich das Verfahren, wenn es sich darum handelt, Sporen durch Färbung kenntlich zu machen.

Zuerst wurden an den Sporen des Penicillium glaucum Versuche angestellt und die am geeignetsten erscheinende Methode für die Färbung der Askosporen der Hefepilze verwendet.

Die Deckglasausstrichpräparate werden nach dem Trocknen 5 Minuten lang in 5% Chromsäurelösung gebeizt und nach dem Abspülen mit Wasser mit Ziehl'schem Karbolfuchsin eine Minute unter einmaligem Aufkochen erwärmt, nach dem Erkalten mit 5%iger Schwefelsäure entfärbt, ausgewaschen und 30 Sekunden mit wässerigem Malachitgrün oder Methylenblau behandelt und zum Schluss gut abgewaschen.

Die Sporen allein werden durch die Schwefelsäure nicht entfärbt und heben sich in leuchtendem Rot von den grünen, respektiv blauen unveränderten Hefezellen ab.

Durch dieses Verhalten ist die Sporennatur der eigenartigen Gebilde in der Hefezelle bewiesen.

Einigemale glückte es auch, in den Sporen mit den oben angeführten Zellkernfärbungsmitteln Zellkerne nachzuweisen, jedoch nur, wenn die sporentragenden Zellen 24 Stunden in frische Nährlösung verbracht waren.

Die Aufbewahrung sämtlicher Dauerpräparate geschah zu Beginn durch Einbetten in Xylolcanadabalsam, wobei ich die unangenehme Erfahrung machte, dass Schrumpfungen eintraten; ich benützte daher später ausschliesslich als Einbettungsmaterial eine konzentrierte Rohrzuckerlösung, welche zur Verhütung von Schimmelbildung mit etwas Jodoform versetzt war.

Durch einen Lackring wird dem Verdunsten des Lösungsmittels vorgebeugt und zeichnet sich diese Einschlussflüssigkeit durch ihr starkes Lichtbrechungsvermögen aus.

Nachdem bei den Tinktionsmethoden bereits des öftern von Sporen die Rede war, möchte ich jetzt auf dieselben näher eingehen und zugleich einen Vergleich ziehen zwischen den bei den Bakterien beobachteten Sporen und den Ascosporen der Saccharomyceten.

Bei Verschlechterung des Nährbodens, sei es durch die Entziehung oder das Aufgebrauchtsein der Hauptnährstoffe bei grossen und zahlreichen Kolonien, sei es durch Einwirkung äusserer Umstände tritt entweder ein Absterben der einzelligen Individuen ein, die allmählig dabei auftretenden Veränderungen werden als Involutionserscheinungen bezeichnet, oder es wird die Bildung eigenartiger Vegetationsformen bewirkt, welche offenkundig den Zweck haben, die Art solange lebensfähig zu erhalten, bis wieder günstigere äussere Verhältnisse sich darbieten; man bezeichnet diese Gebilde als Dauersporen; dieselben sind noch nicht bei allen bis jetzt erforschten Bakterienarten beobachtet worden, auch kommen noch andere diese Sporenbildung befördernde, oft individuelle Momente hin-

zu, ebenso verschieden bei den verschiedenen Spezies ist die Auskeimungsform der betreffenden Sporen.

Die grosse Widerstandsfähigkeit solcher Sporen äusseren Agentien gegenüber ist bedingt durch die unverhältnismässig resistente Membran, welche dieselben umgiebt und lässt den Schluss zu, die Sporen als Dauerformen zu bezeichnen.

Gegen Farblösungen sind dieselben ziemlich negativ, nur mit den stark wirkenden unter denselben und auch da nur durch Kochen ist es möglich, sie zu färben; einmal gefärbt behalten sie den Farbstoff mit grosser Hartnäckigkeit zurück, so dass selbst beim Behandeln mit 5% Schwefelsäure keine Entfärbung eintritt.

Analoge Verhältnisse weisen die Saccharomyceten auf und es ist das grosse Verdienst von Reess, diese in wissenschaftlicher Weise untersucht zu haben.

Entzieht man einer üppig sich entwickelnden Hefe plötzlich die Nahrung, indem man dieselbe in dünner Schicht auf Scheiben von Kartoffeln, Möhren oder Topinamburknollen aufstreicht, und setzt bei Anwesenheit von Feuchtigkeit dieselben der Luft aus, so zeigen sich nach Verlauf einer gewissen Zeit bei geeigneter Temperatur Veränderungen, welche verschieden sind von sprossender Hefe. Es entstehen im Innern der lebenskräftigsten, vakuolenarmen Zellen, das heisst in deren Protoplasma eine, zwei, ja sogar drei und vier Tochterzellen mit eigener Membran, welche sich durch ihr starkes Lichtbrechungsvermögen gegenüber dem trüblichen übrigen Zellinhalt auszeichnen und, da von einer gemeinsamen Mutterzellwand umschlossen, sich gegenseitig an den Be-

rührungsflächen abplatten und eine den Lykopodiumsporen ähnliche Form annehmen.

Da dieser Vorgang freier Zellbildung bei den Askomyceten sich in gleicher Weise abspielt, so stellte Reess die Saccharomyceten zu den Askomyceten.

Für die Wahrscheinlichkeit dieser Theorie sprach gleich anfangs das Verhalten dieser Askosporen bei der Keimung, indem aus ihnen echte durch Sprossung sich vermehrende Hefezellen entstehen.

Diese Beobachtungen und die daraus gefolgerten Schlüsse wurden von einigen Seiten heftig angegriffen; Brefeld besonders bestritt die Sporennatur dieser Gebilde, Möller kam zu dem Resultate, dass die Hefen keine Sporen bilden, auch keinen Askus besitzen, dass überhaupt eine Fruktifikationsform nicht vorhanden sei.

Auf eine Stelle in Möller's Abhandlung möchte ich hier aufmerksam gemacht haben, da derselbe diese Auffassung als Grund gegen die Annahme, diese Gebilde seien Sporen, anführt, indem er schreibt:

„Zunächst wissen wir heutigen Tages im Gegensatz zu früher, dass eine echte Sporenbildung als Fortpflanzungsprozess bei kräftiger Vegetation in üppiger Ernährung eintritt, nicht wie bei der Entstehungsursache dieser Gebilde nach mehrtägigen Nahrungsmangel bei ausschliesslicher Gegenwart von Wasser und Luft."

Diese Behauptung ist nirgends bewiesen, es ist das gerade noch eine Streitfrage in der Bakteriologie.

Auf Grund eingehender Forschungen hat jetzt Möller ebenfalls sich für die Sporennatur dieser Gebilde erklärt.

Mit Bezug auf die Sporenbildung unternahm es Reess, die Saccharomyceten in ein System unterzubringen

und zu klassifizieren, Hansen ging einen Schritt weiter und benützte diese und umfangreiche eigene Beobachtungen, um Brauereihefe praktisch analysieren zu können.

Derselbe suchte zuerst festzustellen, welchen Einfluss die verschiedenen Temperaturgrade auf die Bildung von Sporen in einer Reinkultur ausübten und fand, dass dieselbe bei niedriger Temperatur langsam vor sich geht, rascher mit steigender Temperatur, jedoch nur bis zu einem gewissen Punkte; passiert man diesen Punkt, dann wird die Entwicklung wieder verzögert, bis sie endlich inne hält, zugleich konnte er konstatieren, dass namentlich die von der höchsten und niedrigsten Temperatur bestimmten Kardinalpunkte charakteristische Merkmale für die Arten geben, das heisst, dass die Temperaturgrenzen, innerhalb welcher die Sporenbildung bei den einzelnen Arten vor sich geht, verschieden sind.

Folgende Verfahren, Sporenbildung zu erzielen, wurden angewendet:

Die einzelne Reinkultur wurde im Zustand des üppigsten Wachstumes mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser durch mehrmaliges Dekantieren von anhängender Nährlösung befreit, um sodann im hängenden Tropfen verteilt in die feuchte Objektträgerkammer zu kommen.

Hinderlich war hierbei der Umstand, dass bei dem Temperaturoptimum von ungefähr 25 ° C sich viel Wasserdampf bildete, welcher sich in mikroskopisch kleinen Tröpfchen kondensierte und so die Beobachtung sehr erschwerte.

Einfacher gestaltete sich die Sache, wenn man die wie oben vorbereitete Hefe in dünner Schicht auf Gips-

blöckchen ausstrich, welche in einer kleinen feuchten Kammer zur Hälfte ihrer Höhe ins Wasser tauchend aufbewahrt wurden.

Da aber Luftwechsel und Schutz gegen Bakterien nötig sind, um die Hefe vor Zersetzung und Verunreinigung zu schützen und Sporenbildung zu ermöglichen, so waren diese Glasdosen mit ihren übergreifenden Deckeln nicht ganz geeignet.

Ich griff daher zu folgender Methode, welche sich sehr bewährte:

Es wurden 150 mm lange, 20 mm breite Gipsblättchen gegossen, diese in entsprechend weite Reagierröhren gesteckt, etwas destilliertes Wasser zugegeben, mit Wattpfropf verschlossen und das Ganze sterilisiert.

Nach dem Erkalten wurde die vorbereitete Hefe in üblicher Weise aufgestrichen und die Röhren in etwas geneigter Lage in einer Temperatur von 25° C belassen.

Auf diese Weise war Sterilisation, Luftzutritt, pilzkeimdichter Abschluss und Beobachtung wesentlich erleichtert.

Bei diesen Versuchen bestätigte sich häufig die von Hansen angeführte Thatsache, dass wenn Kulturen längere Zeit, in der Nähe des Temperaturmaximums gezüchtet waren, die Zellen derartig beeinflusst wurden, dass dieselben ihr Vermögen, Sporen zu bilden, verloren.

Solche Kulturen in Dextrosehefewasser verbracht, erlangten nach einiger Zeit wieder diese Fähigkeit, woraus man schliessen kann, dass die chemische Zusammensetzung der Lösung an dieser Veränderung des Verhaltens schuldig war in Verbindung mit einer zu raschen Vermehrung der Individuen.

Wenn es sich darum handelt, zu Versuchszwecken verschiedene Hefenarten zu züchten, so empfiehlt es sich, sich einer Nährlösung zu bedienen, welche den verschiedenen Ansprüchen genügt, welche die einzelnen Arten an eine solche stellen, um gedeihen zu können, und welche es ermöglicht, kleine Zusätze und Variationen zu machen.

Eine Hauptbedingung ist völlige Klarheit und Durchsichtigkeit, sowie die Eigenschaft, beim Erhitzen auf Siedetemperatur zum Zwecke der Sterilisation sich nicht durch Ausscheidungen zu trüben.

Diesen Anforderungen entspricht nun die bisher mit Vorliebe angewandte Bierwürze nicht, da dieselbe meist dunkel gefärbt ist und nach jedesmaligem Erhitzen eine feine Ausscheidung giebt, welche später die Beobachtung sehr erschwert.

Ähnliche Übelstände zeigte auch ein italienischer Weinmost, der kaum klar zu bekommen war in Folge eigenartiger, durch die Sterilisation hervorgerufener Ausscheidung von Eiweissstoffen.

Um Organismen, welche aus bestimmten Stoffen zusammengesetzt sind, wachsen zu lassen, muss das Substrat die Quelle sein für das Vorhandensein eines jeden einzelnen jener Stoffe.

Bei den untersten Vertretern des Pflanzenreiches kommen nicht allein die den Aschenrückstand bedingenden Mineralsubstanzen in Betracht, wie bei den höheren Pflanzen, welche Kohlensäure, eventuell auch Stickstoff direkt aufnehmen und verarbeiten können; sondern ganz besonders die Zufuhr von Kohlenstoff und Stickstoff in geeigneter Form, denn die chlorophyllfreien, plasmareichen Saccharomyceten verbrauchen relativ grosse Mengen von

Eiweissstoffen bei ihrer zeitenweise sehr raschen Entwickelung und Vermehrung.

Die in erster Linie zu nennenden Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff finden sich in den verschiedenen Kohlehydraten im richtigen Verhältnis vor, wie auch die Natur selbst den wilden Hefen zuckerreiche Flüssigkeiten und Substrate bietet.

Die anorganische Substanz, deren Zusammensetzung durch die Aschenanalyse leicht festgestellt werden kann, besteht nach Mitscherlich im wesentlichen aus 59% Phosphorsäure, 30—40% Kali, 6—8% Magnesia und 1 bis 4% Kalk.

Auffallend ist der verhältnismässige Reichtum an Magnesiumverbindungen im Vergleich zu dem anderer Kryptogamen.

Schwierig war es bis jetzt, das Stickstoffbedürfnis der Hefezellen in künstlichen Nährlösungen zu befriedigen und es ist das Verdienst von Pasteur, Nägeli und andern, hierüber ausgedehnte Versuche angestellt zu haben.

Das Resultat ihrer Forschungen und das anderer Gelehrten lässt sich dahin ausdrücken:

„Der zum Aufbau der eiweissartigen Bestandteile des Hefepilzes notwendige Stickstoff kann ihm verabreicht werden in der Form von leicht diffusibeln Proteinstoffen von der Eigenschaft der Peptone; zur Not auch in der Form von Ammoniaksalzen (weinsaures Ammonium) und von diesen nahestehenden organischen Körpern, für welche ein Kriterium ihrer Nährfähigkeit zur Zeit noch nicht gefunden ist.“

„Salpetersaure Salze, welche von den Schimmelpilzen mit Vorliebe aufgenommen werden und das tauglichste stickstoffhaltige Nahrungsmittel sind für die höheren Gewächse, sowie Hydroxylaminsalze vermögen den Hefepilz nicht mit Stickstoff zu versorgen.“ (Mayer).

Am besten geschieht die Stickstoffzufuhr durch Diastase oder Pepton.

Durch die heute im Handel befindlichen Peptone ist es möglich ohne zu grosse Vermehrung der anorganischen Bestandteile einen sehr guten Ersatz der Eiweisssubstanzen zu verwenden; ich bediente mich später ausschliesslich des Kemmerich's Fleischpeptones, welches ca. 40 % an löslichen Eiweissstoffen enthält.

Nach zahlreichen Versuchen fand ich folgende Nährlösung als die geeignetste für die Kultur von Wein- und Bierhefen.

150,0 reiner Traubenzucker
10,0 saures phosphorsaures Kali
5,0 schwefelsaure Magnesia
20,0 Pepton (Extraktform) Kemmerich zu 1000 cbcm Lösung.

Die einzelnen Substanzen wurden für sich in den nötigen Quantitäten Wasser gelöst, sodann gemischt, zum Kochen erhitzt, filtriert und in der üblichen Weise sterilisiert.

Zur Gewinnung fester Nährböden diente dieselbe Lösung mit 7—8 % Gelatine versetzt, womit sie eine klare, lichtgelbe leicht schmelzende Gelatine bildete.

Die Reaktion der Nährlösung war sauer, eine Reak-

tion, welche sowohl der Wein- und Obstmost, als auch die Bierwürze aufweisen.

Zopf drückt sich diesbezüglich aus: „Stellen sich saure und alkalische Reaktion gleich günstig, so wähle man immer die erstere, um die Spaltpilze leichter abhalten zu können."

Ein Unterschied im Wachstum in dieser Nährlösung war zwischen Wein- und Bierhefen nicht zu bemerken, während Weinhefen in Bierwürze sich nur langsam vermehrten; nicht anwendbar war Koch's Nährbouillon.

Da die Saccharomyceten Gelatine nicht verflüssigen, so ist bei ihrer raschen, räumlichen Ausdehnung und Vermehrung die dicke Masse ein Hindernis, welches nur langsam überwunden wird, auch dürfte der Umstand Berücksichtigung verdienen, dass der Luftsauerstoff nur beschränkt Zutritt findet.

Die von Hansen angeführte Beobachtung, dass Hefe, welche öfters umgeschüttelt wurde, rascher sprosste, sich reichlicher vermehrte und in kürzerer Zeit den Zucker zerlegte, als solche, welche vollständiger Ruhe überlassen war, bestätigte sich auch bei meinen Versuchen.

Dieses Verhalten steht in direktem Widerspruch zu der von Horvath aufgestellten Hypothese über den Einfluss mechanischer Bewegung: „Alle niederen Organismen werden durch mechanische Bewegung ungünstig, durch Ruhe dagegen günstig in ihrer Entwicklung beeinflusst!" und ist wohl darauf zurückzuführen, dass durch Schütteln die Trennung von Mutter- und Tochterzelle leichter erfolgt und die Zweigverbände in einzelne Partien mit grösserer Oberflächenausdehnung aufgelöst werden.

Wohl wenige Lebewesen weisen eine so grosse Widerstandsfähigkeit gegen Temperaturunterschiede auf, wie die Saccharomyceten; wenn auch die Vegetation eingestellt wird, bei Eintritt günstigerer Verhältnisse lebt dieselbe wieder auf.

Eine untere Temperaturgrenze, bei welcher feuchte Hefe eingeht, ist noch nicht gefunden.

Die tötende Temperatur nach oben zu ist direkt abhängig von dem Feuchtigkeitsgehalt der einzelnen Zellen und von dem Umstande, ob dieselben rasch oder ganz allmählig des grössten Teiles ihres Wassers beraubt wurden.

Hefenreinkulturen wurden in Reagiercylindern und Nährlösung im Wasserbade langsam erhitzt und von 45° C an nach jedem weiteren Grade eine Probe herausgenommen und rasch abgekühlt.

Von 50° C an zeigten sich Schrumpfungen, zum Teil auch geborstene Zellen, der Zellinhalt war verändert, von 52° C an waren nur noch einzelne Zellen intakt und mit 54° C war alles abgestorben.

Anders gestaltet sich der Versuch, wenn Hefekulturen, auf Gipsblöckchen aufgetragen, im Schwefelsäuretrockenschrank der grösste Teil ihres Wassergehaltes bei gewöhnlicher Temperatur langsam entzogen wird; solche Kulturen konnten langsam bis 90° C erhitzt werden und zeigten nach sehr behutsamem Abkühlen und allmähliger Wasserzufuhr noch zahlreiche plasmahaltige lebensfähige Zellen, jedoch besitzen nur die vakuolenfreien Gärkraft.

Das Verhalten der Hefe gegen chemische Agentien

und zwar je einer Reinkultur von Weissbierhefe, italienischer Weisswein- und griechischer Rotweinhefe ist tabellarisch zusammengestellt, wozu ich bemerken möchte, das jedesmal nachdem eine prozentualierter steigende Vermehrung des Reagenz gemacht war, nach 2 Stunden eine Impfprobe in Nährlösung gemacht wurde. Wurden dort nach 24 Stunden sprossende Zellen vorgefunden, so war ein weiterer Zusatz notwendig, bei Gegenwart zahlreicher geschrumpfter Zellen wurde angenommen, dass bei längerer Einwirkung alles absterben dürfte.

Auch auf dem Wege der Färbung wurde das Resultat kontrolliert; indem nach Lintner lebenskräftige Zellen keinen Farbstoff aufnehmen, abgestorbene dagegen sofort von demselben durchdrungen werden.

Man fügt zu einer Platinöse der zu prüfenden Hefe einen Tropfen wässeriger Anilinblaulösung, verdünnt mit etwas 10% Zuckerwasser und bringt nach guter Durchmischung einen Tropfen unter das Mikroskop; in normaler, lebenskräftiger Hefe zeigen sich nur wenige Prozente gefärbter Zellen, sobald die Mehrzahl sich gefärbt hatte, konnte angenommen werden, dass der Einfluss der zugesetzten Substanz tödlich war.

Zeigten sich unter dem Mikroskop und im Verhalten gegen Farblösungen noch keine Spuren eingetretener Zerstörung, dagegen entwickelten sich die Impfungen in Nährlösung nicht oder nur sehr langsam, so wurde dieser Grad der Einwirkung als gärungshemmend bezeichnet.

Da es mir leider nicht glückte, sog. Sporenfäden zu erhalten in analoger Weise wie die Milzbrandsporenfäden gewonnen werden, so konnte ich den Einfluss, welchen Tem-

peraturschwankungen und chemische Stoffe auf die Askosporen ausüben, nicht feststellen, um zu beweisen, dass diese Sporenbildung nicht nur bei Entziehung der nötigen Nährstoffe, sondern auch bei sonstigen Angriffen als Mittel zur Erhaltung der Art dient.

Hefeart:	Weissbier.		Ital. Weisswein		Griech. Rotwein		Bemerkungen.
	hemmend	tödlich	hemmend	tödlich	hemmend	tödlich	
Schwefelsäure %	0,2	0,5	0,15	0,3	0,15	0,3	
Chlorwasserstoffsäure %	0,10	0,2	0,10	0,2	0,1	0,2	
Schwefeldioxyd %	Spuren	0,05	Spuren	0,05	Spuren	0,05	
Phenol %	3		2,5		2,5		5% Lösung zerstörte die Hefe nicht. Der angeführte Prozentgehalt verhinderte die Gärung, da nur zu 5% löslich, wurden weitere Versuche nicht gemacht.
Salicylsäure %	0,3		0,3		0,3		Da nicht weiter im Wasser löslich, wurden die Versuche nicht fortgesetzt.
Essigsäure %	2	5	1,5	4	1,4	3,5	Ist ein natürliches Produkt der Alkoholgärung.
Milchsäure %	3,5	5	3	5	3	4,5	
Ameisensäure %	0,4	1,0	0,4	0,8	0,4	0,9	

Propionsäure	%	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	
Buttersäure	%	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	
Äthylalkohol	%	11	14	12	15	13	15	Gewichtsprozente.
Amylalkohol	%	0,3	0,75	0,2	0,6	0,2	0,5	
Kupfersulfat	%	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	Findet sich in natürlichem Most, wenn die Reben mit Kupfersalzen, zur Bekämpfung der Peronospora viticola behandelt waren.
Alkalipolysulphid	%	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	Kommt in den Most beim Schwefeln der Reben gegen Oidium Tuckeri.
Alkali (KOH)	%	0,2	1,0	0,15	0,8	0,2	1,0	
Gerbsäure	%	2	4	1,5	4	3	5	Ist ein natürlicher Bestandteil junger Hefezellen und kann darin durch Ferrisalze nachgewiesen werden.

Beschreibung der Eigenschaften und des Verhaltens der untersuchten Hefearten.

I. Berliner Weissbier.

Die Hefe wurde nach Möllers Vorschlag aus dem Bodensatze von Berliner Weissbierflaschen gewonnen. Dieselbe zeigt nach Form und Verhalten Übereinstimmung mit dem Saccharomyces cerevisiae I Hansen.

Die Zellen sind länglich rund, 5—6μ lang, 4—5μ breit, zeigen zahlreiche Mikrosome und nur wenige, aber grosse Vakuolen; einzelne Zellen sprossen an 2 und 3 Punkten zugleich, die Sporenbildung beginnt bei 20°—25° Celsius nach 30 Stunden, es finden sich 2, 3 bis 4 Sporen in den einzelnen Zellen. Hautbildung mit langgestreckten, walzenförmigen Zellen tritt nach 5 Wochen ruhigen Stehens auf.

In Plattenkulturen zeigten die Kolonien anfangs eine runde, später eine mehr elliptische Form, welche dann in ihrer Kontour der einzelnen Zelle entsprach.

Bei allen Kolonien war das Bestreben, der Luft zuzuwachsen, ein deutlich erkennbares, sobald dieses Ziel erreicht war, breiteten sich dieselben auf der Oberfläche aus, in schwach gewölbter, weisslicher Kuppe sich über dieselbe erhebend.

Die Stichkultur zeigte sich zart gezackt längs des Stichkanales und durch die Kohlensäureentwickelung wurde die Gelatine teilweise zerrissen und in die Höhe gehoben.

Die Strichkultur zeigte bandartige, schwach gelappte Form.

Produktion an Alkohol 5,7 Gew. Prozente.
„ „ Glycerin 0,162 Prozent.
Essigsäure und Bernsteinsäure wurde qualitativ nachgewiesen.

In den verschiedenen als Ausgangsmaterial dienenden Rohhefen wurden ziemlich regelmässig zahlreiche, lebhaft sich bewegende Mikrokokken gefunden, sowie ein grosse Kahmhäute bildendes Mycelium einer Oidiumart.

Die Form des letzteren Pilzes auf den verschiedenen Substraten ist bisweilen derjenigen kahmhautbildender Hefen ähnlich, doch dürfte die Eigenschaft zur Unterscheidung dienen, dass mit Hilfe der oben angeführten Kernfärbungsmethoden in den einzelnen Zellen 3 bis 5 Kerne nachgewiesen werden können und dass er Konidien abschnürt. Die Verzweigung der Hyphen ist häufig rein dichotom.

Auf festem Nährboden wachsen die weissen Mycelfäden senkrecht in die Höhe, einen Filz von eigenartigem Seidenglanz bildend.

II. Italienischer Weinmost.

Durch die Güte des Herrn Professor Dr. Blankenhorn in Karlsruhe gelangte ich in den Besitz von einer Flasche sicilianischen Weinmostes und einer Büchse konzentrierten italienischen Weinmostes.

Der Most war rötlich-gelb, trübe, setzte braune Flocken ab und liess auf dem Filter einen rötlichen Rückstand, aus Schleim und Pektinstoffen bestehend neben sprossenden und abgestorbenen Hefezellen.

Dieser Most wird in Karlsruhe nach einem vom Verfertiger geheim gehaltenen Verfahren aus konzentriertem italienischem Weinmost dargestellt.

Die dekantierte Flüssigkeit wird durch mehrfache Filtration nicht klar, dagegen klärt sie sich unter starker Ausscheidung eiweissartiger Stoffe beim Erhitzen auf 100° C.

Beim Stehen des nicht erhitzten Mostes bildet sich eine von wenigen Schimmelpilzen durchsetzte grauweisse faltige Kahmhaut, welche sich unter dem Mikroskope erweist als aus verschieden langen, zum Teil walzenförmigen Zellen und Zellverbänden bestehend und als Kolonie von Mycoderma vini sich charakterisierte.

Für die Identität mit diesem Pilze spricht auch der Umstand, dass der Zuckergehalt dieses Mostes selbst bei längerer Aufbewahrung kaum zurückgieng, nämlich von 21% auf 20,5%, indem er nicht im Stande ist, Alkoholgärung hervorzurufen.

Wie bereits früher erwähnt, eignete sich dieser Weinmost leider nicht als Nährflüssigkeit aus den oben angeführten Gründen.

Der konzentrierte italienische Weinmost, als Maria F.; Jahrgang 1892 von Mazzara bezeichnet, wird in Italien selbst gewonnen aus frischem Traubensaft von Fratelli Farara et Figli, in Mazzara de Vallo.

Derselbe war von honigartiger Farbe und Konsistenz körnig krystallinisch und zeigte das mikroskopische Bild

eine Menge Hefeformen in den verschiedenen Arten der Entwickelung neben rhombischen Zuckerkrystallen.

Dazwischen befinden sich Stäbchen und Kokken in sehr grosser Menge, welche zum Teil lebhafte Bewegungen zeigen.

Der Zuckergehalt betrug 47 % und trotz sorgfältiger Aufbewahrung an kühlem Orte kam die Masse in ziemlich stürmische Gärung.

Mit den grössten Schwierigkeiten hatte ich zu kämpfen, um aus diesem Gemenge der verschiedenen Lebewesen eine Hefenreinkultur zu gewinnen, und hier zeigte sich in überzeugender Weise, dass gute Resultate sich nach der früher angegebenen modifizierten Kochschen Plattengussmethode erzielen lassen.

Diese Reinhefe zeigt folgende Eigenschaften:

Die Zellen sind rundlich oval, nur die stark sprossenden, am Rande befindlichen sind etwas in die Länge gestreckt, 4—5 μ lang, 3—4 μ breit; neben solchen mit feinkörnigen Protoplasmen zeigen sich auch vakuolenreiche Zellen.

Sporenbildung sehr selten eingetreten. Eigentliche Hautbildung nicht vorhanden, dagegen kommen bei ruhigem Stehen einige Zellverbände an die Oberfläche, wo sich dieselben aber nicht stark ausbreiten.

Die kleinen, beinahe runden Kulturen treten mit gewölbter Decke über die Gelatineschicht, sind glänzend weiss, dehnen sich erst nach längerer Zeit über die Fläche aus, sich zugleich in der Mitte kraterähnlich einsenkend.

Die Stichkultur entwickelt sich von oben nach unten längs des Stichkanales und verzweigt sich sehr langsam, kleine Bläschen bildend, seitwärts in die Gelatine.

Die Strichkultur wurde buchtig, in der Mitte etwas gewölbt.

Produktion an Alkohol 4,5 Gew. Proz.

„ „ Glycerin 0,14 Proz.

Die Gärung war sehr gleichmässig verlaufen und nach 5 Wochen beendigt. Bernsteinsäure qualitativ nachgewiesen. Mit dem von Hansen beschriebenen Saccharomyces Marxianus zeigt dieser Hefepilz grosse Ähnlichkeit.

III. Hefen von griechischen Weissweinen.

Auf Wunsch des Herrn Professor Dr. Reess liess Herr Ott in Würzburg, Konsul von Griechenland, im Februar 1894 von vier verschiedenen Weinsorten griechischen Exportweines, welcher im Ursprungslande selbst eingelegt worden war, Hefe kommen. Dank der vorzüglichen Verpackung kam dieselbe sehr gut in Erlangen an und zeigte einen angenehmen, weinartigen Geruch.

Bezeichnet waren die einzelnen Arten als

Achaier I,
Malvasier II,
Mavrodaphne III,
Tripolitza IV.

I, II und IV waren Weissweinhefen, III dagegen eine Rotweinhefe, welch letztere sich schon durch ihre blassrote Färbung als solche erwies.

Ich hoffte, möglichst verschiedene Arten vor mir zu haben, leider sah ich mich in meiner Erwartung getäuscht, indem die Weissweinhefen sich in ihrer Form, ihrem Verhalten und bei den Gärungsversuchen als gleichartig an-

sprechen liessen, so dass ich meine Beobachtungen für sie gemeinschaftlich unter der Bezeichnung „Griechische Weissweinhefe“ zusammenfassen will.

Gänzlich verschieden verhielt sich die als „Mavrodaphne“ bezeichnete Rotweinhefe, welche demgemäss auch gesondert als „Griechische Rotweinhefe“ beschrieben werden wird.

Die Zellen sind annähernd rund, 4—5 μ lang und breit, besitzen eine zarte Membran, kleine Mikrosome und Zellkerne, wenig Vakuolen. Selten zeigt eine Zelle mehr als eine sprossende Zelle.

Die Kultur musste sehr oft übergeimpft werden auf wechselnde Substrate, sie musste längere Zeit in Hefewasserglykose gezüchtet werden, um bei 25° C Sporenbildung zu beginnen, meist 2, selten 3 Sporen nach 5—6 Tagen Hautbildung vorhanden.

Eigentümlich war die Erscheinung, dass die Bodensatzhefe keinen gleichmässigen Niederschlag bildete, sondern sich in kleine Klümpchen ballte, welche sich am besten vergleichen lassen mit Milchgerinnsel.

Da erst bei 18° C normales Wachstum eintritt, hat die Kolonie in Gelatineplatten die Neigung, sich dem Umfange nach rasch auszubreiten, so dass dieselbe wenig sich über die Oberfläche erhebt. Farbe gelblich-weiss.

Die Stichkultur bekommt schon nach wenigen Tagen starke Risse, weniger verursacht durch rasche Kohlensäureentwicklung, als durch die relativ hohe, austrocknende Temperatur, welche zur Entwicklung notwendig ist.

Die Strichkultur blieb flach, breitete sich aber rasch über die ganze Oberfläche aus.

In Bierwürze war nur sehr langsames Wachstum zu bemerken.

Produktion an Alkohol 5,3 Gew. Prozent
„ „ Glycerin 0,31 Prozent

Bernsteinsäure nachgewiesen.

Ende der anfangs rasch verlaufenden Gärung 5 Wochen.

In zwei Rohhefen traten auch die bizarren, leicht zu Verwechslungen führenden Formen von Dematium pullulans auf, was ich der Vollständigkeit halber bemerken möchte.

IV. Griechische Rotweinhefe.

Die Zellen sind länglich oval, nach einer Seite sich etwas zuspitzend 4—5 μ lang 3 μ breit; sie besitzen eine zarte Membran, wenig Mikrosome und kleine Vakuolen. Sprossung tritt mit Vorliebe am spitzen Ende auf, Sporenbildung nach 6 Tagen bei 28° C meist 2 Sporen, in der Längsaxe neben einander liegend.

Die schwache Hautbildung tritt gegen Ende der Gärung, welche am besten zwischen 22 -26° C verläuft, ein; Dauer der Hauptgärung 4 -5 Wochen.

Die Gelatineplattenkolonien drängen rasch an die Oberfläche, erheben sich pyramidenförmig über dieselbe und biegen sich in einer gewissen Höhe nach der Seite um, auf diese Weise kleine Gemshörnchen darstellend Farbe rein weiss.

Die Stichkultur entwickelte sich wenig in die Tiefe, dagegen breitete sie sich an der Einstichstelle stark aus, walzenförmige Protuberanzen bildend.

Am interessantesten gestaltete sich die Strichkultur indem längs des Impfstriches die oben erwähnten weissen Hörnchen dicht neben einander auftraten, eine Erscheinung, wie sie bei keiner andern Art beobachtet wurde.

Produktion an Alkohol 6,3 Gew. Prozente
„ „ Glycerin 0,14 Prozent
Bernsteinsäure konnte nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Alkohol, Glycerin, Essigsäure und Bernsteinsäure geschah, um den Beweis anzutreten, dass bei der Gärung nicht nur der Zucker in Alkohol und Kohlensäureanhydrit gespalten wird, sondern dass der Vorgang ein komplizierterer ist.

Heute schon eine Gleichung hiefür aufstellen zu wollen, wäre verfrüht; vielleicht entstehen intermediäre Produkte, aus welchen dann durch weitere Umsetzungen das Endresultat sich zusammensetzt.

Erwähnenswert ist noch der Umstand, dass durch den Mangel an Kalkverbindungen die Entwicklung von den sonst überall in Hefen sich vorfindenden Krystallen von Calciumoxalat ausgeschlossen war, da aber die Oxalsäure sich nicht nachweisen liess, ist der Schluss berechtigt, dass die entstehende Oxalsäure, wenn sie nicht unlöslich gemacht wird, weiter zerfällt.

Ein weiterer Umstand dürfte noch angeführt werden, nämlich die Eigenschaft der Weinhefen südlicher Provenienz, erst bei einer 20° C übersteigenden Temperatur einen glatten Verlauf der Gärung zu zeigen, was sich dadurch erklären lässt, dass in ihrem Heimatlande die Bedingungen hiefür schon gegeben sind.

Während die mit Peptonzusatz hergestellte Nährlösung einen Bouillongeschmack und Geruch aufwies,

waren dieselben nach der Gärung vollständig verschwunden; das alkoholische Destillat besass einen angenehmen Geruch, etwas an Wein erinnernd, doch war ein richtiges Weinbouquet nicht zu erkennen, was mit der allgemeinen Ansicht übereinstimmt, dass sich das spezifische Weinaroma erst aus den Schleimsubstanzen des Mostes bei der Gärung entwickelt.

Die alkoholische Gärung zuckerhaltiger Flüssigkeit ist bedingt durch die Gegenwart von Microorganismen, welche bei gewissen Temperaturen diese Umsetzungen hervorrufen, indem sie zugleich sich vermehren.

Die Familie der Saccharomyceten, welche hauptsächlich als Gärungserreger anzusehen ist, charakterisiert sich durch die 2 Arten der Fortpflanzung:

1) durch Sprossung,
2) durch Sporenbildung.

Jede Hefezelle besitzt einen Zellkern, welcher aber nur durch gewisse Färbmethoden sichtbar gemacht werden kann.

Chemischen Agentien gegenüber verhalten sich die verschiedenen Hefearten ziemlich gleich.

Aus den angeführten Gärversuchen ist zu entnehmen, dass das Stickstoffbedürfnis der Saccharomyceten durch Peptone befriedigt wird.

Während bei der Darstellung des Bieres stets die Gärung eingeleitet wird durch absichtlichen Zusatz von Hefe, seit kurzer Zeit beinahe allgemein durch Zusatz

einer Reinkultur, ist bei Gewinnung von Wein aus Traubensaft dem Zufall der grösste Spielraum eingeräumt.

Hoffentlich liegt die Zeit nicht mehr ferne, in welcher überall dem Moste eine erprobte Reinkultur zugefügt wird, um dadurch nicht mehr von allen möglichen Zufällen abhängig zu sein, wie es in einzelnen Betrieben bereits geschieht.

Hindernd dürfte hierbei nur der Umstand sein, dass durch die Art seiner Gewinnung der Most mit verschiedenen Organismen beladen ist und eine Befreiung von denselben ohne Veränderung der sonstigen Zusammensetzung nicht so einfach sich bewerkstelligen lässt.

Möge es der Technik gelingen, die richtigen Mittel und Wege zu finden.

Ein Schritt nach vorwärts wurde an verschiedenen Orten gemacht durch Heizbarmachung der Weinkeltern, indem zur Zeit der Weinlese häufig in unserem Klima die Temperatur unter die Grenze herabsinkt, welche notwendig ist, um die Hauptgärung zu beginnen und zu unterhalten.

Die Bedeutung solcher Neuerungen ist nicht zu verkennen, die Erfolge in der Brauereitechnik beweisen es zur Genüge.

Vorliegende Arbeit wurde im botanischen Institute der k. Bayr. Friedrich-Alexanders-Universität ausgeführt auf Anregung des Herrn Professors Dr. M. Reess.

Es drängt mich, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer für seine Anleitung und bereitwillige Unterweisung meinen ehrfurchtsvollen aufrichtigen Dank auszudrücken.

Lebenslauf

des

Fritz von Neudeck,

Sohn des Wilhelm Heinrich von Neudeck, Bankkontrolleurs und Bertha, geb. Schell in Stuttgart, geboren am 4. März 1867 zu Stuttgart, evangelisch.

Ich besuchte die Elementaranstalt und das humanistische Eberhard-Ludwigsgymnasium in meiner Vaterstadt, nach bestandener Prüfung für Obersekunda (VIII Klasse) begann ich meine pharmazeutische Laufbahn in Stuttgart und beendigte meine Lehrzeit in Bietigheim.

Meine 4jährige Gehilfenzeit verbrachte ich in Ludwigsburg, Zürich, Neuchâtel, Genf, Metz und Lahr, worauf ich im Winter-Semester 1889/90 meine Studien an der k. technischen Hochschule in Stuttgart antrat.

Im Sommersemester 1891 bestand ich die pharmazeutische Approbationsprüfung und setzte meine Studien bis Sommersemester 1892 während meiner Dienstzeit als Militärapotheker in Stuttgart fort.

Nach kürzerem Aufenthalt in Frankfurt a. M. wurde ich im Sommersemester 1893 an der k. bayr. Friedrich-Alexanders-Universität immatrikuliert und am 14. November 1894 zur mündlichen Promotionsprüfung nach Annahme vorstehender Dissertation zugelassen.